

ARTIKEL PENELITIAN

Dampak Hipoksia Sistemik terhadap Malondialdehida, Glial Fibrillary Acidic Protein dan Aktivitas Asetilkolin Esterase Otak Tikus

Andriani¹, Ani Retno Prijanti,^{2*} Ninik Mudjihartini,²
Sri Widia A. Jusman²

¹Program Magister Ilmu Biomedik,

²Departemen Biokimia dan Biologi Molekuler FK Universitas Indonesia

*Korespondensi: aniretno@gmail.com

Diterima 9 April 2015; Disetujui 13 Juni 2016

DOI: 10.23886/ejki.4.6287.112-8

Abstrak

Hipoksia sistemik menyebabkan berkurangnya oksigen dan energi di otak sehingga memicu pelepasan neurotransmitter asetilkolin, meningkatkan radikal bebas dan glial fibrillary acidic protein (GFAP) yang berfungsi menjaga kekuatan membran. Tujuan penelitian untuk melihat gambaran adaptasi otak pada hipoksia sistemik terhadap fungsi asetilkolin esterase, kerusakan membran sel neuron dan astrosit. Penelitian dilakukan di Laboratorium Biokimia & Biologi Molekuler FK Universitas Indonesia, pada tahun 2013. Penelitian ekperimental ini menggunakan hewan coba tikus sprague dawley yang diinduksi hipoksia sistemik yang diambil jaringan otak bagian korteks dan plasma tikus. Kelompok tikus terdiri atas kelompok kontrol, kelompok perlakuan induksi hipoksia hari ke-1, 3 hari, 5 hari dan hari ke-7. Parameter yang diukur adalah kadar malondialdehida (MDA) otak dan plasma, aktivitas spesifik enzim AChE jaringan otak serta kadar GFAP jaringan otak. Hasil menunjukkan bahwa hipoksia sistemik tidak meningkatkan kadar MDA otak dan plasma. Induksi hipoksia sistemik meningkatkan aktivitas spesifik enzim AChE dan kadar GFAP jaringan otak secara bermakna. Pada plasma tidak terjadi peningkatan kadar GFAP. Hipoksia sistemik selama hari ke-7 belum menyebabkan kerusakan oksidatif, namun memperlihatkan peningkatan aktivitas AChE dan adaptasi astrosit melalui peningkatan GFAP.

Kata kunci: hipoksia, astrosit, glial fibrillary acidic protein, malondialdehida, asetilkolin esterase

Systemic Hypoxia Effect on Rat Brain Malondialdehyde, Glial Fibrillary Acidic Protein, and Acetylcholine Esterase Activity

Abstract

Systemic hypoxia causes lack of oxygen and energy in brain that trigger the release of acetylcholine, free radical and Glial fibrillary acidic protein (GFAP), a specific protein in astrocyte cells that act to strengthen astrocyte membrane. The aim of the research was to evaluate the damages of brain in systemic hypoxia through activity of acetylcholine esterase, neuron and astrocyte membran damages. The research conducted at the Chemistry and Molecular Biology Laboratory, FM Universitas Indonesia, in 2013. Twenty-five male sprague dawley rats were subjected to systemic hypoxia divided into 5 group of by placing them in the hypoxic chamber supplied 8-10% of O₂ for 0, 1, 3, 5, and 7 days. Malondialdehyde (MDA), acetylcholine esterase specific activity and glial fibrillary acidic protein concentration were measured in plasma and brain tissues. The result show that 7 day systemic hypoxia did not increase MDA concentration in plasma and brain tissues, but increase significantly the specific activity of acetylcholine esterase and GFAP concentration in brain tissues. Systemic hypoxia as long as 7 day did not cause oxidative stress, but show increasing of AChE activity and astrocyte adaptation through increasing of GFAP in brain tissues.

Keywords: hypoxia, astrocyte, malondialdehyde, acetylcholine esterase, glial fibrillary acidic protein.

Pendahuluan

Oksigen merupakan senyawa yang sangat penting bagi otak. Walaupun berat otak hanya sekitar 2% berat badan, tetapi otak memerlukan sekitar 50% dari oksigen tubuh dan hampir 70% glukosa tubuh. Kondisi hipoksia dapat merusak sel-sel neuron penyusun otak dan dapat berujung pada kematian sel. Hipoksia sistemik berpengaruh terhadap aliran oksigen di otak. Bagian otak yang paling rentan terhadap kondisi hipoksia adalah bagian hipokampus dan korteks terutama pada substansia abu-abu. Otak tikus bagian korteks dan hipokampus memiliki pO_2 yang lebih tinggi dibandingkan dengan bagian lain.¹ Hal tersebut berarti tingkat konsumsi oksigen di bagian tersebut lebih tinggi.

Penurunan drastis oksigen di otak menyebabkan otak mengalami metabolisme anaerob sehingga ketersediaan ATP menjadi rendah. Kondisi hipoksia menyebabkan kematian sel neuron dalam hitungan menit karena otak merupakan bagian yang sangat sensitif terhadap keadaan hipoksia. Hipoksia memicu berbagai rangkaian jalur yang menyebabkan penurunan energi dan pelepasan glutamat ke ekstraseluler. Sel neuron dan glia dapat mengalami kematian melalui berbagai sebab seperti eksitotoksitas, edema seluler, stres oksidatif, dan inflamasi. Hipoksia meningkatkan pembentukan *reactive oxygen species* (ROS) yang mengakibatkan stres oksidatif pada sel. Peningkatan kadar ROS merupakan penyebab utama kerusakan jaringan otak setelah hipoksia. ROS merusak jaringan secara langsung melalui modifikasi protein seluler, lipid dan DNA. Secara tidak langsung ROS mengganggu pensinyalan seluler dan pengaturan ekspresi gen. Asam lemak tidak jenuh paling rentan terhadap serangan radikal bebas. Tingginya kadar asam lemak tidak jenuh dalam fosfolipid di membran sel membuat membran sel menjadi sasaran utama radikal bebas. Akibatnya, terbentuk lipid peroksida dengan produk akhir pemecahannya berupa malondialdehid (MDA).²

Peningkatan Ca^{2+} intraseluler juga menyebabkan fusi vesikel neurotransmitter dengan membran presinaps diikuti pelepasan neurotransmitter ke celah sinaps. Transmisi sepanjang sinaps akan dilanjutkan melalui pengikatan neurotransmitter dengan reseptor di membran pasca sinaps. Dalam sistem saraf pusat asetilkolin (ACh) merupakan salah satu neurotransmitter yang berfungsi untuk menghantar impuls saraf. Asetilkolin disintesis oleh neuron-

neuron kolinergik. Neuron kolinergik juga mensintesis asetilkolinesterase (AChE) untuk menghentikan aksi neurotransmitter asetilkolin. Asetilkolinesterase bekerja sangat cepat mendegradasi ACh menjadi asam asetat dan kolin. Perubahan kadar Ca^{2+} intraseluler pada kondisi hipoksia meningkatkan pelepasan ACh menuju celah sinaps. Peningkatan pelepasan ACh diikuti oleh peningkatan sintesis AChE.³

Astrosit berperan penting terutama dalam komunikasi antara astrosit-neuron melalui pelepasan beberapa faktor neurotropik untuk mempertahankan homeostasis sistem saraf pusat. Astrosit juga berperan dalam menjaga homeostasis di lingkungan sekitar neuron. Penelitian baru-baru ini menunjukkan bahwa astrosit bersifat imunokompeten dalam otak. Bila terjadi gangguan di otak yang menimbulkan kerusakan, astrosit akan mengalami aktivasi dan bergerak cepat ke lokasi kerusakan (astrogliosis).⁴ Pada aktivasi yang berlebihan ternyata astrosit meningkatkan produksi beberapa zat salah satunya adalah *glial fibrillary acidic protein* (GFAP), yang merupakan petanda terjadinya astrogliosis. Astrogliosis merupakan mekanisme pertahanan otak untuk mencegah kerusakan yang lebih berat. Mekanisme pensinyalan terhadap peningkatan ekspresi GFAP akibat cedera hipoksia belum jelas diketahui. Peningkatan glutamat ekstraseluler ternyata meningkatkan fosforilasi GFAP. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa kadar GFAP serum sangat berkaitan dengan volume kerusakan otak. Hipoksia pada neonatus dapat menyebabkan GFAP cell+ menjadi neuron kortikal.⁵

Penelitian ini bertujuan untuk menilai dampak hipoksia sistemik kronik terhadap kerusakan jaringan otak. Tujuan khusus penelitian ini adalah menilai respon hipoksia sistemik kronik terhadap kadar MDA otak dan plasma, aktivitas spesifik ChE jaringan otak dan kadar GFAP jaringan otak dan plasma.

Metode

Penelitian ini memakai tikus sprague dawley sebanyak 4 kelompok perlakuan dengan tiap kelompok perlakuan terdiri atas 5 ekor tikus. kelompok perlakuan terdiri atas kelompok perlakuan hipoksia hari ke-1, hari ke-3, hari ke-5 dan hari ke-7. Kelompok tanpa perlakuan digunakan sebagai kontrol. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biokimia & Biologi Molekuler Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, pada tahun 2013.

Tikus hipoksia dipelihara dalam sungkup hipoksia (10% oksigen 90% Nitrogen) sesuai kelompoknya. Kemudian tikus didekapitasi dan dibedah untuk diambil darah dan jaringan otak. Darah EDTA disentrifugasi pada kecepatan 5000g selama 10 menit. Plasma yang didapatkan disimpan dalam *ultra low temperature freezer* -80°C.

Sebelum pengukuran, parameter jaringan otak dipisahkan menjadi korteks dan hipokampus untuk dibuat homogenat masing masing jaringan.

Pembuatan Homogenat Jaringan Otak

Jaringan otak ditimbang kurang lebih sebanyak 100mg dan ditempatkan pada test tube 1½ mL. Sebanyak 0,5mL PBS 0,1M pH 7,4 ditambahkan ke dalam test tube 1,5mL. Kemudian difortor dengan mesin homogeneser yang telah dipasang mikropestel dan dilumatkan hingga homogen lalu ditambahkan 0,5mL PBS 0,1M pH 7,4 sehingga volume menjadi 1mL. Setelah disentrifugasi pada kecepatan 5000g selama 10 menit, supernatan yang dihasilkan disimpan pada suhu -20°C. Bila berat jaringan otak kurang dari 100mg, penambahan 0,5mL PBS 0,1M pH 7.4 disesuaikan jumlahnya sehingga didapatkan konsentrasi homogenat sebesar 10%.

Pengukuran Kadar Malondialdehid (MDA)

Pengukuran kadar MDA dilakukan dengan metode Wills.⁶ Prinsipnya adalah MDA direaksikan dengan asam tiobarbiturat sehingga terbentuk senyawa berwarna yang memberikan serapan maksimal pada panjang gelombang 530nm. Bahan yang digunakan adalah: homogenat jaringan otak, plasma darah, larutan asam trikloroasetat (TCA) 20%, larutan asam tiobarbiturat (TBA) 0,67% dan larutan standar tetraetoksipropan (TEP).

Standar tetraetoksipropan (TEP) yang diencerkan 1:80.000 dan plasma yang akan diuji masing-masing diambil sebanyak 400uL ditambah 200 uL TCA 20% dan kemudian campuran divortex sehingga terlihat keruh. Campuran kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 5000g selama 10 menit. Supernatan dipisahkan untuk pemeriksaan selanjutnya dan presipitat dibuang. Sebanyak 400uL TBA 0,67% ditambahkan ke dalam supernatan dan dilanjutkan dengan pemanasan di atas penangas air 96°C selama 10 menit. Setelah itu larutan disentrifugasi kembali pada kecepatan 5000g selama 5 menit dan supernatant dibaca serapannya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 530nm.

Pengukuran Aktivitas Spesifik Enzim AChE

Pengukuran aktivitas spesifik enzim ChE menggunakan metode kolorimetrik dengan kit RANDOX. Butiril kolinesterase dapat menghidrolisis butirilkolin, menghasilkan tiokolin dan butirat. Tiokolin bereaksi dengan DTNB menghasilkan 2-nitro-5-merkaptobenzoat, senyawa berwarna kuning yang serapannya dapat diukur pada panjang gelombang 405nm.

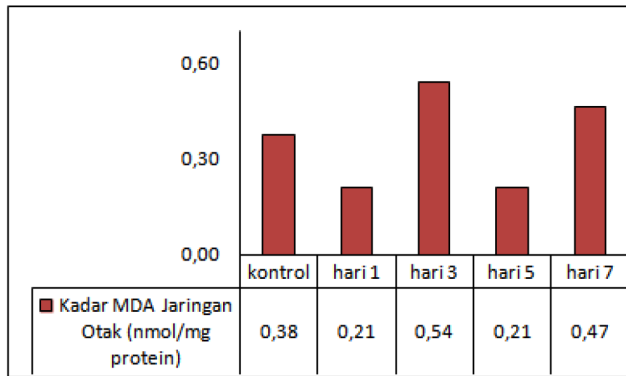
Pengukuran Kadar GFAP Otak dan Plasma

Pengukuran kadar GFAP otak dan plasma menggunakan kit ELISA Rat GFAP dari Cusabio. Setiap larutan standar dan sampel diambil 100µL dimasukkan ke dalam sumur, dan diinkubasikan selama 2 jam pada suhu 37°C. Setelah itu cairan dibuang tanpa dicuci. Selanjutnya ditambahkan 100µL biotin-antibodi tanpa pengenceran ke dalam tiap sumur. Permukaan mikroplat ditutup dengan *adhesive strip*. Mikroplat diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C, kemudian didiamkan pada suhu ruang dan mikroplat digoyang dengan hati-hati untuk mencampur sampai cairan tampak homogen. Selanjutnya cairan dihisap dan sumur dicuci dengan 200µL bufer pencuci berulang sebanyak 3 kali. Pencucian dilakukan dengan pipet saluran ganda. Tiap kali menambahkan bufer pencuci mikroplat didiamkan selama 2 menit, kemudian cairan dibuang dan mikroplat dibalik diletakkan di atas kertas tisu bersih. Setelah dicuci ditambahkan 100µL HRP-avidin tanpa pengenceran kemudian permukaan mikroplat ditutup dengan *adhesive strip* dilanjutkan inkubasi selama 1jam pada suhu 37°C. Kemudian dicuci dengan cara seperti langkah sebelumnya sebanyak 5 kali. Setelah itu cairan dibuang lalu ditambahkan 90µL substrat TMB ke tiap sumur dan diinkubasi 15-30 menit pada suhu 37°C, di tempat gelap. Terakhir, ditambahkan *stop solution* ke dalam tiap sumur, lalu mikroplat diketuk-ketuk perlahan untuk memastikan cairan tercampur dengan baik. Serapan diukur pada panjang gelombang 450nm.

Hasil

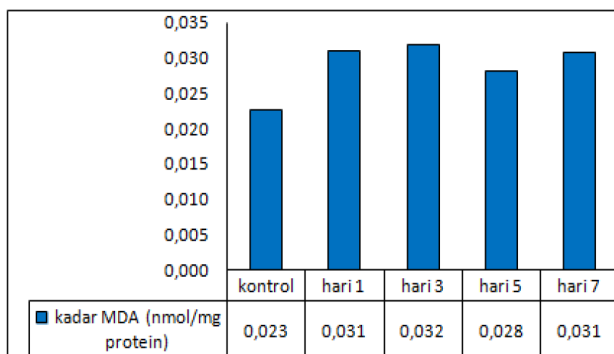
Analisis Kadar MDA

Hasil pemeriksaan kadar MDA dengan menggunakan metode Wills digunakan untuk melihat kerusakan oksidatif terhadap asam lemak tidak jenuh jamak (*poly unsaturated fatty acid*, PUFA) membran sel saraf.



Gambar 1. Kadar MDA Jaringan Otak antar Kelompok Tikus

Kadar MDA otak berbeda pada tikus kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Kadar MDA otak menurun pada induksi hipoksia hari pertama dan meningkat pada hari ke-3. Kadar MDA otak menurun kembali pada hipoksia hari ke-5 dan meningkat lagi pada hari ke-7, namun perbedaan kadar MDA otak antara tikus kelompok kontrol dan kelompok perlakuan tidak bermakna ($p=0,410$).



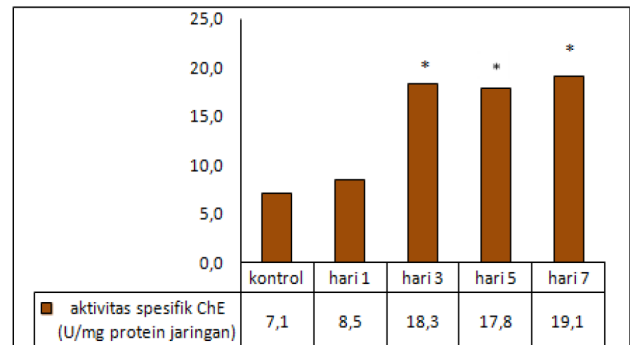
Gambar 2. Kadar MDA Plasma antar Kelompok Tikus

Kadar MDA plasma antar kelompok pada tikus yang diinduksi hipoksia sistemik tidak berbeda bermakna secara bermakna ($p=0,348$), walaupun di Gambar 2 terlihat bahwa terjadi peningkatan kadar MDA plasma di tikus kelompok perlakuan dibandingkan tikus kelompok kontrol. Korelasi antara kadar MDA jaringan otak dan plasma rendah serta tidak bermakna ($r=0,222$, $p=0,719$).

Hasil Pengukuran Aktivitas Spesifik Enzim AChE Jaringan Otak

Hasil pengukuran aktivitas spesifik enzim AChE jaringan otak menggunakan kit butirilkolinesterase dari RANDOX. Berdasarkan Gambar 3 terlihat bahwa hipoksia sistemik kronik berpengaruh

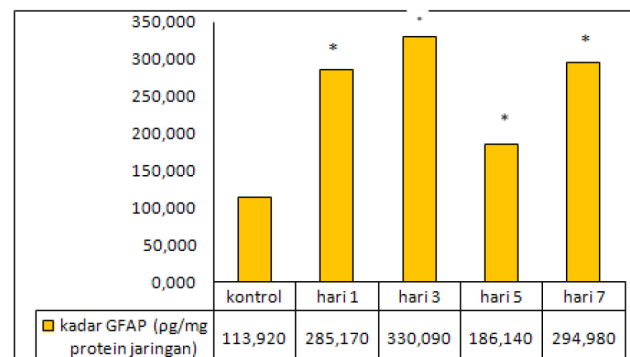
terhadap aktivitas spesifik enzim AChE di jaringan otak ($p<0,001$). Aktivitas spesifik ChE jaringan otak tikus kelompok perlakuan lebih tinggi dibandingkan kontrol. Pada uji *posthoc* tikus kelompok induksi hipoksia hari ke-3, ke-5, dan hari ke-7 menunjukkan aktivitas spesifik AChE jaringan otak lebih tinggi bermakna dibandingkan kelompok kontrol ($p\leq 0,05$) sedangkan aktivitas spesifik ChE kelompok tikus hipoksia hari ke-1 tidak berbeda bermakna dibandingkan kelompok kontrol ($p=0,638$).



Gambar 3. Aktivitas Spesifik Enzim AChE Jaringan Otak

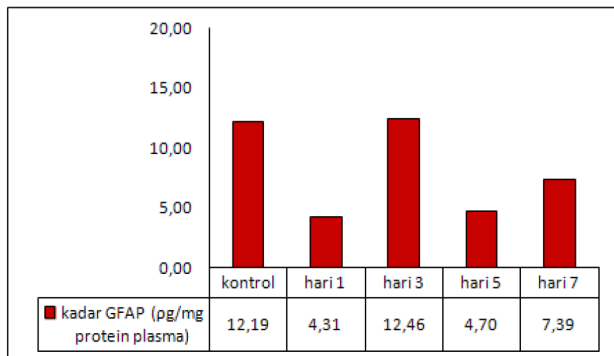
Pengukuran Kadar GFAP Jaringan Otak dan Plasma

Hasil pengukuran kadar GFAP menggunakan kit ELISA Rat GFAP dari Cusabio, dapat dilihat di Gambar 4. Hipoksia sistemik kronik berpengaruh terhadap kadar GFAP jaringan otak ($p<0,001$). Gambar 5 menunjukkan peningkatan kadar GFAP otak tikus kelompok perlakuan dibandingkan kontrol. Pada uji *posthoc* (LSD) semua kelompok perlakuan menunjukkan kadar GFAP otak yang berbeda bermakna dengan kontrol ($p\leq 0,05$).



Gambar 4. Kadar GFAP di jaringan otak

Hasil pengukuran kadar GFAP dalam plasma tikus dapat dilihat pada gambar 5. Walaupun kadar GFAP plasma tikus perlakuan menunjukkan perubahan kadar terhadap kontrol, perubahan pada nilai kadar GFAP antar kelompok tidak berbeda bermakna ($p=0,444$). Korelasi kadar GFAP jaringan otak dan plasma menunjukkan hubungan negatif rendah tidak bermakna (Pearson, $r=-0,107$, $p=0,864$).



Gambar 5. Kadar GFAP dalam Plasma

Pembahasan

Pada penelitian ini didapatkan hasil tidak terdapat perbedaan bermakna kadar MDA otak pada hipoksia sistemik kronik dengan kontrol normoksia. MDA sebagai produk utama hasil oksidasi PUFA sering dipakai sebagai indikator untuk mengetahui tingkat kerusakan sel.⁷ Pada kondisi hipoksia terjadi penurunan kemampuan sel untuk menghasilkan ATP.⁸ Kondisi hipoksia mengakibatkan peningkatan pembentukan ROS di dalam sel. Sumber ROS pada kondisi hipoksia terutama berasal dari mitokondria dan aktivitas enzim NADP(H) oksidase dan xantin oksidase.

Peningkatan pembentukan ROS ini tidak langsung menimbulkan kondisi stres oksidatif bagi sel. Sel akan menjaga keseimbangan dengan meningkatkan pembentukan senyawa atau reaksi yang bersifat anti oksidan. Kekurangan oksigen di sel menyebabkan berkurangnya pembentukan energi yang terutama dihasilkan pada metabolisme aerob.^{4,8} Setiap sel akan berusaha mengimbangi dan mempertahankan homeostasis terutama sel-sel yang sangat aerobik melalui reperfusi. Pemulihan aliran oksigen juga dapat merugikan karena terjadi cedera reperfusi akibat peningkatan drastis pembentukan ROS melalui rantai transpor elektron di mitokondria.⁸ ROS dapat bereaksi dengan makromolekul di dalam sel seperti DNA dan protein atau dengan lipid membran sehingga

merusak fungsi sel. ROS yang berikatan dengan lipid di membran (PUFA) menghasilkan senyawa MDA yang menjadi penyebab peningkatan kadar MDA di sel yang mengalami hipoksia.^{7,8}

Penelitian Wanandi *et al*⁹ menyatakan bahwa di otak terjadi peningkatan aktivitas *manganese superoksida dismutase* (MnSOD) yang merupakan antioksidan endogen. Aktivitas MnSOD meningkat pada hipoksia hari ke-1, hari ke-7, dan hari ke-14. Aktivitas MnSOD menurun kembali pada hipoksia hari ke-21. Aktivitas MnSOD di jaringan otak lebih tinggi dibandingkan dengan aktivitas MnSOD di jaringan lain seperti jantung dan darah. Hal tersebut mungkin menjadi penyebab tidak berbeda bermaknanya kadar MDA otak antar kelompok. ROS yang terbentuk akan secara aktif ditangkal oleh MnSOD jaringan otak yang bekerja sangat cepat.⁹

Kadar MDA plasma pada penelitian ini juga menunjukkan perubahan tidak bermakna pada kelompok perlakuan jika dibandingkan dengan kelompok kontrol, walaupun terlihat peningkatan di kelompok perlakuan. Peningkatan kadar MDA plasma terjadi mulai hipoksia hari ke-1 dan hari ke-3, sedikit menurun pada hipoksia hari ke-5 dan meningkat lagi pada induksi hipoksia hari ke-7. Pada hipoksia sistemik terjadi peningkatan pembentukan ROS di berbagai jaringan sebagai dampak penurunan ATP. MDA dalam plasma dapat berasal dari berbagai jaringan.^{10,11} Stres oksidatif di berbagai jaringan seperti ginjal, hati, jantung, darah tikus akibat hipoksia sistemik. Selain dalam plasma dan jaringan, MDA juga dapat dideteksi di urin.¹¹

Rerata kadar MDA otak lebih tinggi dibandingkan rerata kadar MDA pada plasma. Pada kondisi hipoksia sistemik jaringan berespons terhadap kondisi hipoksia menghasilkan MDA yang dapat masuk ke dalam plasma darah. MDA yang terdeteksi dalam plasma berasal dari jaringan yang mengalami peroksidasi lipid di membran selnya; di dalam plasma tidak terdapat sel.¹¹ Kadar MDA dalam otak lebih tinggi dibandingkan plasma terjadi karena di otak terdapat sawar darah otak yang membatasi aliran molekul ke dalam dan ke luar sel-sel dalam otak. Hal tersebut diperkuat dengan kadar GFAP yang lebih tinggi di jaringan otak yang berarti sawar darah otak masih berfungsi dengan baik pada kondisi hipoksia sistemik. Salah satu fungsi GFAP adalah turut menjaga integritas sawar darah otak.^{12,13}

Hipoksia sistemik kronik juga berpengaruh terhadap neurotransmitter dalam otak. Dalam penelitian ini dibuktikan pengaruh hipoksia sistemik kronik terhadap kerja neurotransmitter

asetilkolin di otak berupa perubahan bermakna aktivitas spesifik enzim AChE. Peningkatan aktivitas AChE disebabkan oleh peningkatan sintesis neurotransmitter ACh. Kecepatan sintesis secara umum diatur seiring dengan aktivitas neuron. Setelah disintesis, neurotransmitter ditranspor dan disimpan ke dalam vesikel. Pengelepasan neurotransmitter dari vesikel dipicu oleh impuls saraf yang mendepolarisasi membran *postsinaps* dan menyebabkan influks Ca^{2+} melalui kanal kalsium *voltage-gated*. Influks Ca^{2+} menyebabkan fusi vesikel dengan membran diikuti pelepasan neurotransmitter ke celah sinaps.¹⁴ Transmisi sepanjang sinaps melalui pengikatan neurotransmitter dengan reseptor di membran *postsinaps*.⁷ Aksi neurotransmitter asetilkolin dihentikan oleh enzim AChE.¹⁵

Peningkatan aktivitas AChE karena hipoksia sistemik juga ditemukan pada penelitian Burgula *et al.*¹⁶ Penelitian tersebut menggunakan model tikus yang diinduksi hipoksia pada hipobarik karena ketinggian, ditemukan bahwa peningkatan aktivitas AChE sebesar 63%. Pimentel *et al.*¹⁷ mengamati aktivitas AChE pada model tikus yang mengalami hipoksia-iskemia perinatal ternyata juga ditemukan peningkatan aktivitas AChE.

Hipoksia di otak menyebabkan berkurangnya transporter untuk *uptake* glutamat ke dalam sel neuron maupun astrosit.¹⁸ Hal tersebut menyebabkan kadar glutamat dalam celah sinaps meningkat. Peningkatan kadar glutamat dalam celah sinaps meningkatkan pengikatan glutamat terhadap reseptor NMDA dan reseptor AMPA. Pengikatan glutamat terhadap reseptornya ini menyebabkan terbukanya pintu masuk ion Ca^{2+} sehingga jumlah Ca^{2+} intrasel semakin meningkat.¹⁹ Peningkatan Ca^{2+} intrasel dapat dibuktikan dengan peningkatan aktivitas spesifik enzim AChE di jaringan otak, yaitu peningkatan aktivitas enzim dapat terjadi apabila substrat yaitu ACh bertambah banyak.

Eksresi protein GFAP di jaringan otak dan plasma juga meningkat pada penelitian ini. Terdapat perbedaan bermakna kadar GFAP otak antar kelompok sedangkan dalam plasma peningkatan kadar GFAP tidak bermakna. Hipoksia sistemik membuat otak beradaptasi dengan memperkuat struktur astrosit dengan cara proliferasi dan aktivasi tergantung pada derajat gangguan yang terjadi di otak. Pada aktivasi berlebihan astrosit meningkatkan pembentukan GFAP yang merupakan petanda terjadinya astrogliosis.¹⁹ Pada kondisi otak yang normal secara imunohistokimia GFAP tidak dapat terdeteksi. GFAP baru dapat

terdeteksi secara imunohistokimia pada kondisi astrogliosis ringan. Semakin berat derajat astrogliosis semakin meningkat juga ekspresi GFAP.^{19,20}

Pada penelitian ini terlihat peningkatan GFAP jaringan otak terjadi mulai induksi hipoksia hari ke-1 kemudian menurun pada hari ke-5 namun masih lebih tinggi dari kontrol. Pada induksi hari ke-7 kadar GFAP mulai meningkat kembali. Tikus kelompok hipoksia hari ke-3 meningkat paling bermakna kadar GFAP jaringan terhadap kelompok kontrol apabila dibandingkan dengan kelompok perlakuan lain. Burtrum *et al.*¹⁹ melaporkan bahwa mRNA GFAP mulai dapat dideteksi dalam otak tikus neonatus setelah hari ke-1 mengalami hipoksia fokal karena ligasi arteri karotis.

Kadar GFAP plasma tidak berbeda bermakna antar kelompok, bahkan terdapat kelompok perlakuan memiliki kadar GFAP plasma yang lebih rendah. Hal tersebut mungkin disebabkan pada hipoksia sistemik produksi GFAP akan meningkat yang salah satunya bertujuan untuk memperkuat struktur sawar darah otak.¹² Neonatus dengan kondisi ensefalopati hipoksia iskemik menunjukkan kadar GFAP yang meningkat di dalam serum. Bembea *et al.*²⁰ melakukan penelitian pada pasien anak-anak yang menderita penyakit kardiovaskular yang sedang menjalani terapi *extracorporeal membrane oxygenation* (ECMO).

Komplikasi yang sering timbul akibat terapi ECMO adalah kerusakan neurologik akut. Pada penelitian tersebut ditemukan bahwa terjadi peningkatan kadar GFAP secara bermakna pada serum akibat kerusakan otak sebagai efek terapi ECMO. Perbandingan rerata kadar GFAP jaringan otak dan plasma menunjukkan perbedaan bermakna; rerata kadar GFAP jaringan otak lebih tinggi dibandingkan rerata kadar GFAP dalam plasma. Kondisi tersebut dapat disebabkan induksi hipoksia sistemik pada penelitian ini diduga belum menimbulkan kerusakan otak sehingga MDA maupun GFAP memiliki kadar yang sangat tinggi di jaringan otak dan memiliki kadar MDA dan GFAP rendah dalam plasma.

Peningkatan kadar GFAP dan aktivitas spesifik enzim AChE adalah bentuk adaptasi untuk mencegah cedera otak. Pada penelitian ini tidak diamati fungsi saraf tikus untuk menilai gangguan akibat hipoksia sistemik terhadap fungsi sensorik, motorik maupun fungsi yang berkaitan dengan memori yang berpusat di bagian korteks dan hipokampus.

Kesimpulan

Hipoksia sistemik sampai dengan hari ke-7 tidak menyebabkan kerusakan jaringan otak dapat dilihat dari korelasi yang lemah tidak bermakna antara kadar MDA otak dan plasma, serta korelasi rendah tidak bermakna antara kadar GFAP otak dan plasma. Peningkatan bermakna kadar GFAP dan aktivitas spesifik enzim AChE di jaringan otak merupakan bentuk adaptasi untuk mencegah cedera otak.

Daftar Pustaka

1. Raodova H, Vokorkova M, Koudelova J. Hypoxia-induced lipid peroxidation in the brain during postnatal ontogenesis. *Physiol Res*. 2012;Suppl 1:S89-101.
2. Starkov AA, Chinopoulos C, Fiskum G. Mitochondrial calcium and oxidative stress as mediators of ischemic brain injury. *Cell Calcium*. 2004;36:257-64.
3. Changeux JP, Edelstein SJ. Allosteric mechanisms in normal and pathological nicotinic acetylcholine receptors. *Curr Opin Neurobiol*. 2001;11:369-77.
4. Brahmachari S, Yiu KF, Pahan K. Induction of glial fibrillary acidic protein expression in astrocytes by nitric oxide. *The J Neurosci*. 2006;26(18):4930-9.
5. Bi B, Salmasao N, Komitova M, Simonini MV, Silbereis J, Cheng E, Kim J, et al. Cortical glial fibrillary acidic protein-positive cells generates neurons after perinatal hypoxic injury. *The J Neurosci*. 2011;31(25):9205-21.
6. Garman RH. Histology of the central nervous system. *Toxicologic Pathology*. 2011;39:22-35.
7. Miller DB, O'Callaghan JP. The concentration of glial fibrillary acidic protein increases with age in the mouse and rat brain. *Neurobiol Aging*. 1991;12(2):171-4.
8. Wanandi SI, Dewi S, Jusman SWA, Sadikin M. Expression of manganese superoxide dismutase in rat blood, heart and brain during induced systemic hypoxia. *Med J Indones*. 2011;20:27-33.
9. Broughton BRS, Reutens DC, Sobey CG. Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia. *Dallas : American Heart Association*. 2009;40:e331-9.
10. Fisk L, Nalivaeva NN, Boyle JP, Peers CS, Turner AJ. Effects of hypoxia and oxidative stress on expression of neprilysin in human neuroblastoma cells and rat cortical neurones and astrocytes. *Neurochem Res*. 2007;32:1741-8.
11. Rodnight R, Goncalves CA. Control of the phosphorylation of the astrocyte marker glial fibrillary acidic protein (GFAP) in the immature rat hippocampus by glutamate and calcium ions : possible key factor in astrocytic plasticity. *Braz J Med Biol Res*. 1997;30:325-38.
12. Messing A, Brenner M. GFAP: functional implications gleaned from studies of genetically engineered mice. *GLIA*. 2003;43:87-9.
13. Chathu F, Krishnakumar A, Paulose CS. Acetylcholine esterase activity and behavioral response in hypoxia induced neonatal rats: effect of glucose, oxygen and epinephrine supplementation, *Brain Cogn*. 2008;68(1):59-66.
14. Schreiner AE, Berlinger E, Langer J, Kafitz KW, Rose CR. Lesion-induced alterations in astrocyte glutamate transporter expression and function in the hippocampus. *ISRN neurology*. 2013 Sep 3;2013.
15. Muthuraju S. Acetylcholinesterase inhibitors enhance cognitive functions in rats following hypobaric hypoxia. *Behav Brain Res*. 2009;203:1-14.
16. Burgula S, Medisetty R, Jammulamada N, Musturi S, Ilavazhagan G, Singh SS. Downregulation of PEBP1 in rat brain cortex in hypoxia. *J Mol Neurosc*. 2012;41(1):36-7.
17. Bano D, Nicotera P. Ca²⁺ Signals and neuronal death in brain ischemia. *Am Heart Assoc: stroke*. 2007;38:674-6.
18. Ennen CS, Huisman TA, Savage WJ, Northington FJ, Jennings JM, Everett AD, et al. Glial fibrillary acidic protein as a biomarker for neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy treated with whole-body cooling [abstrak]. *Am J Obstet Gynecol*. 2011;205(3):251.
19. Burtrum D, Silverstein FS. Hypoxic-ischemic brain injury stimulate glial fibrillary acidic protein mRNA and protein expression in neonatal. *Exp. Neurol*. 1994;126:112-8.
20. Bambea MM, Savage W, Strouse JJ, Schwartz JE, Graham E, Thompson CB, et al. Glial fibrillary acidic protein as a brain injury biomarker in children undergoing extracorporeal membrane oxygenation. *Pediatr Crit Care Med*. 2011;12(5):572-9.